

L1 ANSWER 1 OF 1 WPIDS COPYRIGHT 2001 DERWENT INFORMATION LTD
AN 1997-001737 [01] WPIDS
DNC C1997-000492
TI Clavibacter michiganensis DNA fragments - useful as diagnostic probes and
primers.
DC C07 D16 K08
IN HORVAIS, A
PA (UYAN-N) UNIV ANGERS
CYC 1
PI FR 2733754 A1 19961108 (199701)* 29p <--
ADT FR 2733754 A1 FR 1995-5416 19950505
PRAI FR 1995-5416 19950505
AB FR 2733754 A UPAB: 19970102

Single-stranded fragments of Clavibacter michiganensis genomic DNA coding for 16S RNA are new, where the fragments comprise at least one sequence having at least 70% homology with sequence (I) and/or (II) or their complementary sequences. GCGAAAGTGACGGTACCTGCA (I) TATACCGACTTGCGCGGCACA (II).

USE - The DNA fragments are used as probes and primers for detecting C. michiganensis infections, e.g. in tomatoes.

ADVANTAGE - Using the new primers (I) and (II) in a standard PCR amplification, it was possible to detect 1 bacterium in 10 mul of sample (i.e. by detecting an amplification product of 592 bp). The presence of a high number of contaminating bacteria did not affect the sensitivity of detection.

Dwg.0/3

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 733 754

(21) N° d'enregistrement national :

95 05416

(51) Int Cl⁶ : C 07 H 21/00, C 12 Q 1/68

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 05.05.95.

(30) Priorité :

(43) Date de la mise à disposition du public de la
demande : 08.11.96 Bulletin 96/45.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule.*

(60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

(71) Demandeur(s) : UNIVERSITE D ANGERS — FR.

(72) Inventeur(s) : HORVAIS ALAIN.

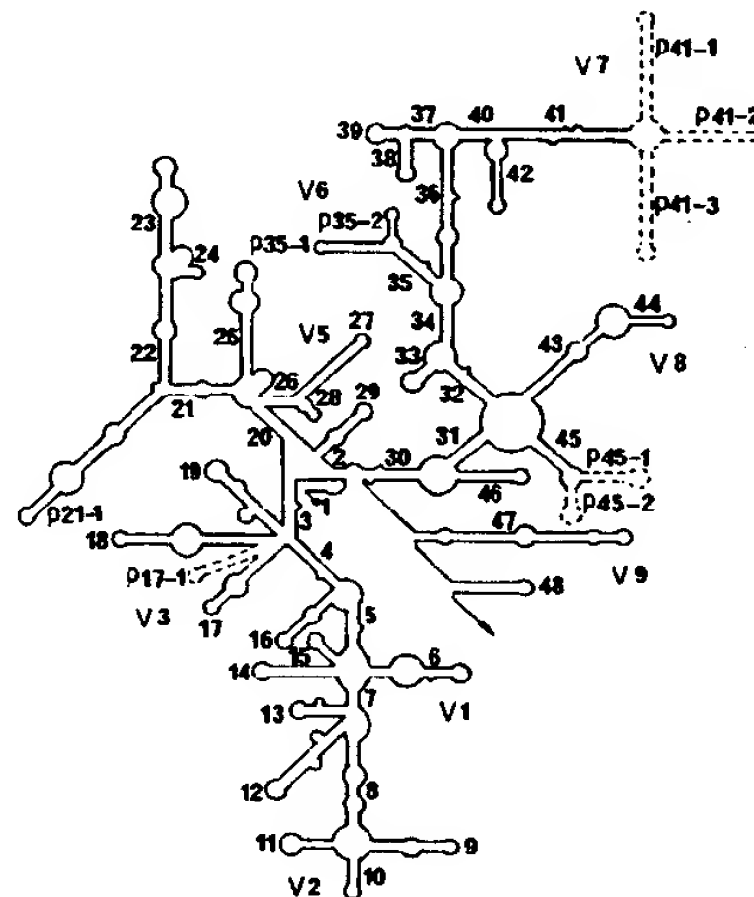
(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire : CABINET DAWIDOWICZ.

(54) FRAGMENT DE L'ADN GENOMIQUE DE CLAVIBACTER MICHIGANENSIS, SONDE D'HYBRIDATION,
AMORCE D'AMPLIFICATION, REACTIF ET PROCEDE DE DETECTION DE CLAVIBACTER MICHIGANENSIS.

(57) L'invention concerne une ou plusieurs séquences nu-
cléotidiques utilisées à visée de diagnostic pour la détec-
tion de la présence de *Clavibacter michiganensis* et le pro-
cédé de détection.

L'invention consiste en ce qu'un fragment monocaténaire
de l'ADN génomique de *Clavibacter michiganensis* codant
pour l'ARN 16S, une sonde susceptible de s'hybrider spé-
cifiquement avec l'ADN génomique de *Clavibacter michiga-
nensis* et une amorce pour la polymérisation de l'ADN gé-
nomique de *Clavibacter michiganensis* sont caractérisés
en ce qu'ils comprennent au moins une séquence nucléoti-
dique présentant au moins 70% d'homologie avec au
moins une séquence nucléotidique choisie parmi les sé-
quences nucléotidiques, séquence N°1, séquence N°2
identifiées dans la description, et leurs séquences complé-
mentaires respectives.



FR 2 733 754 - A1



5

10

- 15 Fragment de l'ADN génomique de Clavibacter michiganensis,
sonde d'hybridation, amorce d'amplification, réactif et
procédé de détection de Clavibacter michiganensis.

La présente invention concerne un fragment de l'ADN génomique
20 de Clavibacter michiganensis, une sonde susceptible de
s'hybrider spécifiquement avec l'ADN génomique de Clavibacter
michiganensis, une amorce pour amplifier spécifiquement l'ADN
génomique de Clavibacter michiganensis, un réactif et un
procédé pour détecter sélectivement dans un échantillon
25 biologique ladite bactérie, mis en oeuvre avec la sonde ou
l'amorce de l'invention.

Les Clavibacter sont des bactéries Gram(+) appartenant aux
actinomycètes, aérobies strictes non sporulantes.

30

Jusqu'en 1988, les Clavibacter étaient classés dans les
Corynébactéries (Collins et Bradbury, 1986), groupe
taxonomique ayant subi de nombreuses modifications ces
dernières années. Depuis 1988, ces Corynébactéries
35 phytopathogènes ont été reclassées dans le nouveau groupe des
Clavibacter suivant en cela les travaux de Carlson et
Vidaver, qui, dès 1982, montraient que 7 des 14
corynébactéries phytopathogènes pouvaient former un groupe

taxonomique comprenant 4 espèces différentes (aujourd'hui
appelées *Clavibacter michiganensis*, *tritici*, *rathayi* et
iranicum), les *Clavibacter michiganensis* se divisant eux-
mêmes en 4 sous espèces : *Clavibacter michiganensis* sous-
5 espèce *michiganensis*, *nebraskense*, *sepedonicum* et *insidiosum*.

Une des principales caractéristiques des *Clavibacter* est que
chaque espèce ou sous-espèce n'est pathogène que d'une seule
plante, et qu'il est rare de pouvoir en isoler à partir
10 d'autres plantes. Ainsi, le *Clavibacter michiganensis* sous-
espèce *michiganensis* est un pathogène de la tomate
(*Lycopersicon esculantum*), responsable de la maladie du
chancre de la tomate, affection majeure des variétés de
plein-champ et de serre. Le *Clavibacter michiganensis* sous-
15 espèce *michiganensis* n'est transmis en général que par les
semences de tomate, semences sur ou dans lesquelles on peut
le retrouver (Tsiatos, 1986 ; Rat, 1984). Dans le cas d'une
transmission par des techniques culturales (taille,
rempotage, arrosage...), les effets plus tardifs du pathogène
20 sont moins dommageables pour les cultures (Dullahide, 1983 ;
Dhanvantari, 1989).

Ce pathogène peut survivre en conservant son pouvoir
pathogène pendant 18 mois dans des sols infestés par des
25 cultures précédentes de tomates contaminées et quelques mois
sur les structures et le matériel d'une exploitation
(Strider, 1967 ; Moffet, 1984).

Les symptômes externes, caractérisés par des taches brunes
30 entourées d'un halo blanc (dites en oeil d'oiseaux) se
transformant en zones de nécroses, n'apparaissent, en
général, que vers la maturité de la plante sur les feuilles,
les tiges, les inflorescences et les fruits, bien que la
bactérie puisse être présente dans la plante bien avant
35 l'apparition de ces symptômes. Ceci rend son diagnostic
précoce difficile.

Les symptômes internes n'apparaissent eux aussi que sur les plantes adultes. Ils consistent en l'apparition de tâches jaunes ou brun foncé sur les vaisseaux du bois ; la moelle paraît intacte au début, mais peut se creuser par la suite. A 5 terme, le feuillage devient grillé et les fruits verts ont tendance à tomber (Strider, 1969).

Ces atteintes se répandent ensuite rapidement sur l'ensemble de la plante et conduisent à la perte des fruits (Lelliott, 10 1988). Ainsi, des pertes de récolte en champs de près de 70 % peuvent être observées (Lelliott, 1988).

Décrite pour la première fois en 1910 par E.F. Smith, la maladie s'est étendue depuis dans toutes les zones du globe.

15

Actuellement, la caractérisation des germes fait appel à des techniques biochimiques appliquées à des bactéries isolées de macérats de graines de tomate, méthodes complétées par des tests d'inoculation sur matériel végétal sain, pour vérifier 20 le pouvoir pathogène des souches. Ceci nécessite 3 à 4 semaines de délai pour obtenir un résultat (Gardan et Luisetti, 1986).

Bien que des tests de détection par immunofluorescence aient 25 été décrits précédemment (Trigalet, 1974 ; De Boer, 1982), aucune technique d'enzymologie, d'immunologie ou de biologie moléculaire rapide et suffisamment fiable pour être homologuée n'a pu être développée pour le diagnostic des *Clavibacter* (Thompson et coll., 1988 ; Johansen et coll., 30 1989), et ce malgré l'existence de 2 sondes d'ADN spécifiques du *Clavibacter michiganensis* sous-espèce *michiganensis* (Thompson et coll., 1988) et du *Clavibacter michiganensis* sous-espèce *insidiosum* (Rasmussen et coll., 1989). Ceci tient au fait que l'utilisation de ces sondes nécessite 35 d'avoir recours au préalable à des techniques très lourdes d'extraction des acides nucléiques, comprenant en particulier des séparations par centrifugation en gradient de caesium.

Aucune variété de tomate cultivée n'est aujourd'hui résistante à ce pathogène (Leterrot et coll., 1978), et aucun traitement n'a pu être mis au point pour combattre la maladie ou désinfecter de façon efficace les semences contaminées
5 (Tsiantos, 1987 ; Dhanvantari, 1989). Il apparaît donc aujourd'hui primordial de pouvoir diagnostiquer de manière fiable, rapide et économique la présence du *Clavibacter michiganensis* sous-espèce *michiganensis* sur des lots de semences.

10

Le but de la présente invention est donc de proposer une ou plusieurs séquences nucléotidiques utilisées sous forme de sonde, d'amorce ou de réactif à visée de diagnostic pour permettre de détecter la présence du *Clavibacter*
15 *michiganensis* dans les semences de tomates, suffisamment spécifiques pour détecter le *Clavibacter michiganensis* sous-espèce *michiganensis* parmi d'autres espèces bactériennes les plus proches, simples à mettre en oeuvre et suffisamment fiables pour ne pas détecter en particulier des bactéries
20 mortes.

La présente invention concerne à cet effet un fragment monocaténaire de l'ADN génomique de *Clavibacter michiganensis* codant pour l'ARN 16S, caractérisé en ce qu'il comprend au
25 moins une séquence nucléotidique présentant au moins 70 % d'homologie avec au moins une séquence nucléotidique choisie parmi les séquences nucléotidiques, séquence N°1, séquence N°2 identifiées dans la description, et leurs séquences complémentaires respectives. Par séquence complémentaire on
30 entend toute séquence s'hybridant totalement avec la séquence représentée.

Un second objet de l'invention concerne une sonde susceptible de s'hybrider spécifiquement avec l'ADN génomique de
35 *Clavibacter michiganensis*, ladite sonde comprenant au moins une séquence nucléotidique présentant au moins 70 % d'homologie avec au moins une séquence nucléotidique choisie

parmi les séquences nucléotidiques, séquence N°1, séquence N°2 et leurs séquences complémentaires respectives.

Un troisième objet de l'invention est de réaliser une amorce
5 (ou "primer") pour la polymérisation de l'ADN génomique de Clavibacter permettant une amplification de l'ADN génomique de Clavibacter michiganensis par différents moyens tels que par la technique de réaction en chaîne de la polymérase encore appelée PCR, par transcription inverse ou par réaction
10 de ligation en chaîne. Cette amorce comprend une séquence nucléotidique présentant au moins 70 % d'homologie avec au moins une partie d'une séquence de l'ADN génomique de Clavibacter michiganensis, cette séquence étant choisie parmi les séquences nucléotidiques, séquence N°1, séquence N°2 et
15 leurs séquences complémentaires respectives.

Selon les techniques d'amplification envisagées, il est préférable d'utiliser un couple d'amorces comprenant au moins une amorce de l'invention. De préférence, pour obtenir le
20 degré de spécificité voulu, il est nécessaire d'utiliser une première amorce ayant au moins 70 % d'homologie avec la séquence N°1 et une deuxième amorce ayant au moins 70 % d'homologie avec la séquence N°2.

25 Chaque amorce peut indifféremment jouer le rôle d'amorce de capture ou d'amorce de révélation. L'amorce de capture comprend ladite séquence N°1 ou N°2 couplée à un marqueur ou associée à une séquence nucléotidique particulière. L'amorce de révélation comprend ladite séquence N°1 ou N°2 couplée à
30 un marqueur permettant la révélation.

Le quatrième objet de l'invention est un réactif pour détecter sélectivement le Clavibacter michiganensis dans un échantillon biologique mettant en application une sonde ou un
35 couple de sondes de l'invention telles que décrites ci-dessus. Dans ce cas, les techniques mises en oeuvre sont constituées par des techniques d'hybridation moléculaire comprenant une phase d'hybridation et une phase de détection.

Pour permettre la mise en oeuvre de la phase de détection, la sonde nucléique est couplée au préalable à une molécule dont la présence pourra être révélée.

5 De manière analogue, le procédé de détection sélectif de *Clavibacter michiganensis* dans un échantillon biologique peut consister à exposer l'ADN génomique ou l'ARN des bactéries, contenu dans ledit échantillon sous forme de fragment monocaténaire, à au moins une sonde puis à détecter les zones
10 d'hybridation de manière directe ou indirecte. En variante ce procédé peut consister à réaliser une amplification de l'ADN génomique de *Clavibacter michiganensis* en présence d'un système enzymatique adapté et au moins un couple d'amorces et identifier les fragments amplifiés. Toutes les techniques
15 d'hybridation moléculaire ou d'amplification génique connues à ce jour peuvent être mises en oeuvre dans les procédés ci-dessus et notamment les techniques dites "Dot Blot" "Southern" et d'hybridation sandwich ou les techniques de réaction de ligation en chaîne ou Ligase Chain Reaction
20 (LCR), les techniques d'amplification par transcription inverse ou TAS et les techniques de réaction en chaîne de la polymérisation dites PCR.

L'invention sera bien comprise à la lecture de la description
25 suivante d'exemples de réalisation, en référence aux dessins annexés dans lesquels :

la figure 1 représente la structure secondaire de
l'ARN 16S des procaryotes ;

30

la figure 2 représente les séquences respectives de l'ADN codant pour l'ARN 16S de la zone variable V3 des bactéries *Clavibacter michiganensis*, *Clavibacter* non *michiganensis* et *Curtobacterium* et

35

la figure 3 représente les séquences respectives de l'ADN codant pour l'ARN 16S de la zone variable V6

des bactéries *Clavibacter michiganensis*, *Clavibacter non michiganensis* et *Curtobactérium*.

Il a été montré que les ARN de transfert, ARNt compris entre
5 les séquences exprimant les ARNr, peuvent différer d'une
bactérie à l'autre (Lewin, 1986) et que les séquences
exprimant l'ARNr 16S présentent des régions variables,
numérotées classiquement de V1 à V9 (la région V4 n'existant
que chez les eucaryotes). Cette structure secondaire des ARNr
10 16S des procaryotes (établie d'après Gutell et coll., 1990)
est représentée à la figure 1. L'extrémité 5'P est symbolisée
par un cercle noir, l'extrémité 3'OH par une flèche. En gras
sont représentées les régions relativement conservées. Les
régions variables sont numérotées de V1 à V9.

15

Les séquences N°1 et 2, objet de l'invention, ont été
obtenues après séquençage des régions variables V3 et V6 des
ADN codant pour les ARN 16S de différents *Clavibacter*
michiganensis, *Curtobactérium* et *Rhodococcus*. Le
20 positionnement de ces séquences d'ADN codant pour des ARN 16S
est décrit par rapport à la séquence de référence de l'ARN
ribosomique de *E. Coli*, telle que décrite dans : NEEFS J.M. ;
VAN DE PEER Y. ; HENDRIKS L. ; de WACHTER R. (1990) :
"Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences".
25 *Nucleic Acids Research* ; 18, supplement ; 2237-2317.

La figure 2 représente les séquences obtenues après
séquençage des régions variables V3 à V6 des ADN codant pour
des ARN ribosomiques ARNr 16S de trois groupes de souches
30 différents correspondant chacun à une ligne de séquence. Le
groupe N°1 correspondant à la liste de séquence de bases
représentée à la première ligne. Les souches concernées, dont
la numérotation correspond à celle de la collection française
INRA de bactéries phytopathogènes, auprès de laquelle les
35 souches peuvent être obtenues, comprennent :

. Groupe N°1 :

1. le *Clavibacter michiganensis* sous-espèce *michiganensis* ;
N° 2352, souche type ; *Lycopersicon esculentum* (tomate) ;

2. le *Clavibacter michiganensis* sous-espèce *michiganensis* ;
N° 2499, *Solanum nigrum* ;
3. le *Clavibacter michiganensis* sous-espèce *michiganensis* ;
N° 2501, *Capsicum annuum* (piment) ;
- 5 4. le *Clavibacter michiganensis* sous-espèce *insidiosum* ; N°
2404, souche type ; *Medicago sativa* (tabac) ;
5. le *Clavibacter michiganensis* sous-espèce *nebraskensis* ; N°
2405, souche type ; *Zea mays* (maïs).
- 10 Le groupe N°2 correspondant à la deuxième ligne de la liste
des séquences établies dans la figure 2 comprend :
 7. le *Clavibacter iranicus* ; N° 807, souche type ; *Triticum*
aestivum (blé) ;
 8. le *Clavibacter rathayi* ; N° 2406, souche type ; *Dactylis*
15 *glomerata* ;
 9. le *Clavibacter tritici* ; N° 1385, souche type ; *Triticum*
aestivum (blé) ;
- 20 Le troisième groupe correspondant à la troisième ligne de
séquence représentée comprend :
 10. *Curtobactérium flaccumfaciens* pv. *betae* ; n° 2402, souche
type ; *Beta vulgaris* ;
 11. *Curtobactérium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* ; N°
1389 ; *Phaseolus* sp. (haricot) ;
 - 25 12. *Curtobactérium flaccumfaciens* pv. *oortii* ; N° 1384,
souche type ; *Tulipa gesneriana* ;
 13. *Curtobactérium flaccumfaciens* pv. *poinsettiae* ; N° 2403,
souche type ; *Euphorbia pulcherrima*.

30 La séquence N°1 a été identifiée comme suit.

La séquence cible constituée par l'ADNr (ribosomique) codant
pour la région V3 de l'ARNr 16S a été amplifiée à partir de
10⁵ bactéries appartenant à l'un des groupes 1, 2 ou 3
35 précités. Cette amplification a été réalisée à partir des
amorces répondant aux séquences N°3, séquence N°4 dont les
séquences sont représentées à la fin de la description. La
dimension du fragment amplifié obtenu y compris les amorces

est de 199 bases. Ce fragment est flanqué à son extrémité 5' de l'amorce correspondant à la séquence N°3 et à son extrémité 3'OH de l'amorce correspondant à la séquence N°4. La technique d'amplification retenue est la technique de la réaction en chaîne de la polymérase encore appelée PCR (Polymerase Chain Reaction, Sacki et Coll 1983).

Cette technique de polymérase par réaction en chaîne comprend trois étapes :

- 10 - une première étape de dénaturation de l'ADN double brin en deux matrices simple brin ;
- une hybridation avec un couple d'amorces (séquence N°3, séquence N°4) délimitant la région à amplifier ;
- la synthèse par une enzyme, en général une polymérase thermorésistante, du brin complémentaire.

La température de mise en oeuvre de la PCR est de 66°C. Les conditions de PCR sont telles que suit : milieu réactionnel : 1,5 mM MgCL₂, 30 ng de chaque amorce, 0,25 U Taq. Polymerase (Red GOLDSTAR, marque déposée commercialisée par Eurogentec SA). Cette étape est suivie d'une étape de purification par filtration des produits d'amplification au moyen d'un système Centricon 100 (marque déposée) commercialisé par la Société Amicon SA. Dans une étape suivante, il est réalisé une amplification différentielle de ces fragments pour produire l'ADN simple brin. Cette étape d'amplification est réalisée dans les mêmes conditions que ci-dessus à l'exception des concentrations d'amorces qui sont telles que suit :

- Amorce représentée par la séquence N°3 : 2 pmoles 13,4 ng
- 30 Amorce représentée par la séquence N°4 : 50 pmoles 333 ng

Une nouvelle étape de purification par filtration des produits est réalisée au moyen d'un système de type Centricon 100 (marque déposée) commercialisé par Amicon SA. Ensuite, la séquence nucléotidique complète des brins d'ADN complémentaires de chaque fragment est déterminée par la méthode de SANGER F. ; NICKLEN S. ; COULSON A.R. (1977) : DNA

sequencing with chain-terminating inhibitors ; "Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A. 74 ; 5463".

Les alignements de ces séquences permettent de mettre en évidence la série de bases encadrée sur la ligne N°1 correspondant à une séquence de *Clavibacter michiganensis*. Cette séquence correspond à la séquence N°1 représentée en fin de description.

10 De manière analogue, on a obtenu les séquences représentées à la figure 3 après séquençage des régions variables V6 des ADN ribosomiques codant pour les ARNr 16S des trois groupes de souches suivants:

15 Le groupe N°1 comprend :

- 1. le *Clavibacter michiganensis* sous-espèce *michiganensis* ; N° 2352, souche type ; *Lycopersicon esculentum* (tomate) ;
- 5. le *Clavibacter michiganensis* sous-espèce *nebraskensis* ; N° 2405, souche type ; *Zea mays* (maïs).

20

Le groupe N°2 comprend :

- 8. le *Clavibacter rathayi* ; N° 2406, souche type ; *Dactylis glomerata* ;
- 9. le *Clavibacter tritici* ; N° 1385, souche type ; *Triticum aestivum* (blé) ;

25

Le groupe N°3 comprend :

- 11. *Curtobactérium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* ; N° 1389 ; *Phaseolus* sp. (haricot) ;
- 30 12. *Curtobactérium flaccumfaciens* pv. *oortii* ; N° 1384, souche type ; *Tulipa gesneriana* ;
- 13. *Curtobactérium flaccumfaciens* pv. *poinsettiae* ; N° 2403, souche type ; *Euphorbia pulcherrima*.

35 Ces séquences ont été obtenues de la manière suivante : la séquence cible constituée par l'ADNr (ribosomique) codant pour la région V6 de l'ARNr 16S a été amplifiée par PCR à partir de 10⁵ bactéries appartenant à l'un des groupes 1, 2

ou 3 précités. Cette amplification a été réalisée à partir d'un couple d'amorces correspondant aux séquences N°5 et 6 qui sont représentées à la fin de la description. La taille du fragment amplifié obtenu est de 173 bases. Ce fragment est 5' flanqué à son extrémité 5' de l'amorce représentée par la séquence N°5 et à son extrémité 3'OH de l'amorce représentée par la séquence N°6. La température de mise en oeuvre de la PCR est de 60°C. Les conditions de PCR sont identiques à celles décrites pour l'obtention de la séquence N°1 ci-dessus.

Les alignements des séquences obtenues permettent de mettre en évidence la série de bases encadrée sur la ligne N°1 correspondant à une séquence de *Clavibacter michiganensis*. 15 Cette séquence correspond à la séquence N°2 représentée en fin de description.

Ce séquençage de l'ADN ribosomique codant pour les ARNr 16S des zones variables V3 à V6 permet d'identifier deux zones de 20 séquences encadrées sur les figures 2 et 3 correspondant respectivement aux séquences cibles des séquences N°1 et séquence N°2 utilisées comme sondes ou comme amorces. On constate cependant que la sonde correspondant à la séquence N°1 ne permet pas d'établir une distinction entre les 25 *Clavibacter michiganensis* et les *Curtobacterium*. Tel n'est pas le cas de la sonde correspondant à la séquence N°2. C'est pourquoi, pour obtenir le degré de spécificité voulu, on utilisera la plupart du temps un couple d'amorces ou de sondes qui correspondent respectivement aux séquences N°1 et 30 N°2.

L'identification de *Clavibacter michiganensis* au moyen de sondes ou d'amorces conformes à l'invention peut être obtenue au moyen de différentes techniques. Ainsi, on distingue les 35 techniques d'hybridation et les techniques d'amplification.

La technique d'hybridation retenue peut par exemple être celle dite d'hybridation "sandwich". Dans ce cas, l'ADN

purifié est obtenu, selon par exemple la technique d'extraction de l'ADN des *Clavibacter* mettant en oeuvre le protocole décrit par Thompson dans : THOMPSON E. ; LEARY J.V. ; CHUN W.W.WC. (1989) : "Specific detection of
5 *Clavibacter michiganensis* sous-espèce *michiganensis* by a homologous DNA probe". *Gentics* 79(3). 311-314.

L'identification de *Clavibacter michiganensis* peut également être réalisée par hybridation directe sur colonies en
10 utilisant un système de détection non-radioactif et semi-automatisé décrit dans le brevet français N° 90.07249 dont le contenu est incorporé à la présente description, si besoin est. L'identification des souches de *Clavibacter michiganensis* à partir des souches décrites dans les groupes
15 1 ci-dessus a été confirmée selon cette technologie de détection non radioactive.

L'extraction de l'ADN total à partir des colonies est réalisée de la manière suivante. Une colonie bactérienne
20 standardisée à un inoculum 10^9 bactéries est reprise dans 400 µl d'une solution de citrate de sodium 0,1 M contenant 0,85 g de chlorure de sodium. On ajoute 40 µl de détergent désoxychlorate de sodium (1 %). Après incubation 5 minutes à température ambiante, 4 extractions phénol-chloroforme sont
25 effectuées (Maniatis et coll. 1982). L'ADN est précipité à l'éthanol. Le culot est repris dans 100 µl de tampon citrate de sodium. Cette solution est soniquée avec un sonicateur 60 W (Société Bioblock sous la réf. C72442) utilisant une sonde de type "cuphorn" (Société Bioblock sous la réf. C72438) afin
30 d'obtenir une population de fragments de taille majoritaire de 1 kilobase.

Un aliquote correspondant à 10^8 bactéries dans 10 µl est alors identifié par hybridation selon le protocole suivant.
35 Dans une plaque de microtitration (Nom commercial Nunc 439454) est déposée une solution de la sonde oligonucléotidique de capture (sonde séquence N°1) à 1 ng/µl dans du PBS 1X (0,15 M NaCl, 0,05 M phosphate de sodium, pH

7,0). La plaque est incubée 2 h à 37°C puis lavée 3 fois avec 300 µl de PBST (PBS + détergent de marque TWEEN de la Société MERCK). La cible constituée par 10 µl de l'ADN total soniqué est mélangée avec 70 µl de tampon PBS saumon [PBS3X + ADN de sperme de saumon 10 µg/ml, (Société Sigma sous la réf. D9156)] et 10 µl de soude 2N. L'ensemble est neutralisé 5 minutes après, par l'addition de 10 µl d'acide acétique 2N. L'ensemble est ajouté dans le puits en plus de 50 µl d'une solution du conjugué composée de la sonde de détection (séquence complémentaire de la séquence N°2) marquée à la peroxydase à la concentration de 0,1 ng/µl dans un tampon PBS cheval [PBS3X + 10 % sérum de cheval, (Société bioMérieux SA réf. 55842)].

15 La plaque est incubée 1 h à 37°C et lavée par 3X 300 µl de PBS Tween [PBS1X + 0,5 % Tween 20 (Société Merck réf. 822184)].

20 200 µl de substrat PPD (Sigma SA, réf. PS187) sont ajoutés par puits. Après 20 minutes de réaction, l'activité enzymatique est bloquée par 100 µl d'H₂SO₄ 1N et la lecture est effectuée sur un lecteur de microplaques à 492 nm.

25 Le système ne génère pas de bruit de fond puisque le puits contenant l'ADN de saumon du tampon d'hybridation qui est soniqué de la même manière que l'ADN des souches testées, ne génère pas de signal.

30 D'autres techniques d'hybridation moléculaire peuvent également être mises en oeuvre dans le cadre de l'invention. Ces techniques d'hybridation moléculaire comportent toujours une phase d'hybridation suivie d'une phase de détection. La phase d'hybridation peut être réalisée dans des conditions très variées. Il s'agit le plus souvent d'hybridation sur 35 membrane, comme dans le cas des dot-blot (où les acides nucléiques sont déposés et fixés directement en des endroits précis de la membrane) ou de Southern blot dans le cas desquels, après migration sur un gel d'électrophorèse, les

acides nucléiques sont transférés puis fixés sur la membrane. Dans ce cas, ce sont les acides nucléiques cibles, correspondant dans le cadre de l'invention à l'ADN génomique de *Clavibacter michiganensis* qui sont fixés sur la membrane.

- 5 Au contraire, dans le cas d'hybridation sur des supports solides de type microplaques ou billes magnétiques, ce sont les sondes nucléiques correspondant aux séquences N°1 et N°2 qui sont fixées sur ledit support. Le support est sous toute forme appropriée telle que tube, cône, puits, plaque de
- 10 microtitration, feuille, polymère soluble. Il est constitué par un matériau naturel, de synthèse, modifié chimiquement ou non et est, selon la technique retenue, choisi parmi les polystyrènes, les copolymères styrène-butadiène, les copolymères styrène-butadiène en mélange avec des
- 15 polystyrènes, des polypropylènes, des polycarbonates, des copolymères polystyrène-acrylonitrile, des copolymères styrène-méthylméthacrylate de méthyle, parmi les fibres synthétiques Nylon et naturelles, parmi les polysaccharides et les dérivés de la cellulose.

- 20 Après cette phase d'hybridation, une phase de détection intervient. Pour ce faire, la sonde nucléique est couplée au préalable à une molécule dont la présence pourra être révélée.

- 25 Trois types de couplage existent :

- a) les couplages avec un isotope radioactif (^{32}P , ^{35}S , ...), pour lesquels la révélation se fera par autoradiographie.
- 30 b) les couplages avec une molécule enzymatique, pour lesquels la révélation se fait directement, comme la peroxydase ou la phosphatase alcaline ou une enzyme susceptible d'hydrolyser un substrat chromogène, fluorigène ou luminescent (Jablonski
- 35 et coll., 1986 ; Li et coll., 1987).
- c) les couplages avec des séquences nucléotidiques particulières, des composés chimiques chromophores, des

composés chromogènes, fluorogènes ou luminescents, des analogues de bases nucléotidiques ou des molécules inertes (acétyl amino fluorène, biotine, groupement sulfoné, la digoxygénine, des stéroïdes naturels, la digitale), révélées de façon indirecte grâce à des anticorps liés à des systèmes de révélation reconnaissant la molécule couplée à la sonde (Urdea et coll., 1988 ; Heino et coll., 1989 ; Grimont et coll., 1989 ; King et coll., 1989, Cuppels et coll., 1990 ; Wood et coll., 1990).

10

Dans les deux derniers cas b) et c), les systèmes de révélation font intervenir des réactions colorimétriques, la fluorescence ou la chimioluminescence.

15 L'exemple précité faisait intervenir un couplage de type b.

A ces techniques d'hybridation moléculaire, il est toutefois préféré, dans le cadre de l'invention, les techniques d'amplification génique. On citera pour mémoire la technique de réaction de ligation en chaîne et la technique d'amplification par transcription inverse. La technique de réaction de ligation en chaîne ou LCR (Ligase Chain Reaction ; Barany, 1991) est une technique proche de la PCR. Cette technique utilise les propriétés d'une ligase thermorésistante qui permet de lier deux amorces contigües hybridées à la matrice d'ADN, ces deux amorces étant constituées par les séquences N°1 ou N°2 et une amorce choisie parmi les séquences décrites des régions V3 et V6 contigües de celle-ci. L'intérêt de la technique réside dans le fait que si des mésappariements apparaissent lors de l'hybridation des amorces, la réaction de ligation ne peut avoir lieu.

La technique d'amplification par transcription inverse, ou TAS (Transcription-based Amplification System, Kwoh et coll., 1989 ; Compton, 1991), est basée sur l'utilisation simultanée de deux enzymes :

- la transcriptase inverse du virus aviaire de la myéloblastose, qui permet la synthèse d'un ADN complémentaire à partir d'un hétéroduplex ARN/ADN constitué de la matrice ARN à amplifier, hybridée à un oligonucléotide choisi ;
 - 5 - l'ARN polymérase du phage T7, qui, à partir du cDNA cible hybridé à un deuxième oligonucléotide portant la séquence de reconnaissance de cette enzyme, synthétise de 10 à 1000 copies d'ARN.
- 10 Ainsi, à chaque cycle, le coefficient d'amplification obtenu est bien supérieur à 2, comme dans le cas de la PCR, et à partir d'une seule copie de la séquence à amplifier, il est possible en 4 cycles seulement d'obtenir 10^6 copies identiques (Kowh et coll., 1989).
- 15
- Cependant, en raison du développement technique de ces différents procédés, il apparaît aujourd'hui que la technique la plus adaptée aux séquences objet de l'invention est la réaction en chaîne de la polymérase, ou PCR (Polymerase Chain
- 20 Reaction ; Saiki et coll., 1983).
- Un exemple de mise en oeuvre de cette technique va être décrit ci-après.
- 25 1. Préparation des échantillons :
- Il convient tout d'abord dans un premier temps de préparer des échantillons sur lesquels les sondes pourront être testées. Ces échantillons sont obtenus à partir de lots de semences de tomates ayant été soumises à une macération. La
- 30 macération s'effectue dans les conditions suivantes : 50 ml de semence, soit environ 25 g de semence, sont mises à macérer pendant 24 heures sous agitation à 28° dans une solution de macération constituée de tampon phosphate 0,01M ajusté à pH 7,2 et d'acide nalidixique d'une concentration de
- 35 4 mg/l. La solution mère de ce tampon phosphate 10X présente une composition telle que suit :

32,626gNa₂HPO₄12H₂O

1,088gKH₂PO₄

H₂Oqsp11

5

2. Préparation des amorces :

Il convient d'utiliser les séquences N°1 et N°2 spécifiques à l'identification de *Clavibacter michiganensis*. Ces séquences vont être utilisées sous forme d'amorce spécifique pour l'amplification par la polymérisation de l'ADN génomique codant pour l'ARN ribosomique 16S desdites bactéries. Ces amorces sont généralement utilisées sous forme de couple comportant la séquence N°1 et la séquence N°2. La séquence N°1 comme la séquence N°2 peuvent indifféremment constituer l'amorce de capture ou l'amorce de détection.

Le test est basé sur le fait que, si la bactérie recherchée est présente dans l'échantillon, l'oligosonde spécifique correspondant aux séquences N°1 et N°2 va pouvoir s'hybrider à sa séquence cible et l'amplification aura lieu. Sinon, en l'absence de la bactérie recherchée, l'oligosonde ne pourra pas s'hybrider et l'amplification ne s'effectuera pas.

Dans l'exemple décrit, le couple séquence N°1, séquence N°2 détermine une région à amplifier de 592 paires de bases. La température d'hybridation utilisée pour la PCR correspondante (T_m) doit être de 66°C pour assurer la spécificité du test.

Conditions de PCR :

Milieu réactionnel : 1,5 mM MgCl₂, 100 ng de chaque amorce, 0,25 U Taq Polymerase (Red GOLDSTAR, Eurogentec SA). 10 µL d'échantillon, volume final de 50 µl

Cycles PCR :

1 cycle : 10 mn, 95°C

30 cycles : 1 mn 95°C ; 1 mn 66°C ; 30 s 72°C

1 cycle : 10 mn, 72°C.

On obtient ainsi en 2 heures correspondant à environ 30 cycles de réaction 230 séquences double brin théoriquement identiques à celle choisie initialement.

- 5 Chaque amorce peut jouer indifféremment un rôle d'amorce de capture ou d'amorce de révélation. L'amorce de capture qui comprend ladite séquence N°1 ou N°2 est fixée sur un support par absorption passive ou couplée à un marqueur ou associée à une séquence nucléotidique particulière, par exemple, la
- 10 séquence de reconnaissance spécifique de CGN4, comme cela est mis en oeuvre dans le kit captagène -GCN4 commercialisé par Amrad Corporation Australie.

L'amorce de révélation comprend ladite séquence N°1 ou N°2

15 couplée à une molécule biochimique de révélation. Ainsi, dans l'exemple précité, l'amorce de capture (séquence N°1) était fixée directement sur la microplaque de révélation tandis que l'amorce de révélation (séquence N°2) était couplée à la peroxydase.

20

Parmi les marqueurs susceptibles d'être couplés à l'amorce de capture ou à l'amorce de révélation, on peut citer notamment des isotopes radioactifs, des séquences nucléiques, des molécules enzymatiques telles que la peroxydase ou la

25 phosphatase alcaline, ou toute autre enzyme susceptible d'hydrolyser un substrat chromogène, fluorigène ou luminescent, des composés chimiques chromophores, des composés chromogènes, fluorigènes ou luminescents, des analogues de bases nucléotidiques ou des molécules inertes

30 (acétyl amino fluorène, la biotine, groupement sulfoné, la digoxygénine, des stéroïdes naturels, la digitale), révélées de façon indirecte grâce à des anticorps liés à des systèmes de révélation reconnaissant la molécule couplée à la sonde (Urdea et coll., 1988 ; Heino et coll., 1989 ; Grimont et

35 coll., 1989 ; King et coll., 1989, Cuppels et coll., 1990 ; Wood et coll., 1990).

Il est ainsi possible, pour permettre l'automatisation de cette étape de révélation, de réaliser une révélation par hybridation sur support solide de type microplaque, pour visualiser les fragments amplifiés. Pour ce faire, deux
5 sondes (par exemple, la séquence N°1 et la séquence complémentaire de la séquence N°2), du type de celles décrites ci-dessus, situées à l'intérieur de la séquence amplifiée, sont utilisées : la première, correspondant à l'amorce de capture, est fixée sur le support et permet de
10 "capter" le fragment amplifié ; la seconde, correspondant à l'amorce de détection, couplée à un système de marquage non radioactif, entraînant une réaction colorimétrique, permet la révélation.

15 Classiquement, la phase de révélation peut également être réalisée par coloration au bromure d'éthidium des fragments amplifiés séparés sur gel d'électrophorèse.

Lorsque la PCR est réalisée sur des suspensions de
20 *Clavibacter michiganensis* de concentrations connues, par exemple 5.10^6 bactéries/ml, le seuil minimum de détection atteint par cette méthode, en particulier par révélation au bromure d'éthidium est de 1 bactérie pour 10 μ l d'échantillon, soit une concentration de 100 bactéries / ml
25 pour 30 cycles de PCR. La présence d'un grand nombre de bactéries contaminantes n'affecte pas la sensibilité et la spécificité du test. Pour obtenir des résultats fiables, il convient d'utiliser les séquences N°1 et N°2 simultanément, comme précisé ci-dessus.

Séquence N°1 : GCGAAAGTGA CGGTACCTGC A
Séquence N°2 : TATACCGACT TGCGCGGCAC A
Séquence N°3 : CCAGACTCCT ACGGGAGGCA
5 Séquence N°4 : GTATTACCGC GGCTGCTGGC
Séquence N°5 : TTGACGGGGG CCCGCACAAG
Séquence N°6 : TTGCGGGACT TAACCCAACA T

REVENDICATIONS

1. Fragment monocaténaire de l'ADN génomique de *Clavibacter michiganensis* codant pour l'ARN 16S,
5 caractérisé en ce qu'il comprend au moins une séquence nucléotidique présentant au moins 70 % d'homologie avec au moins une séquence nucléotidique choisie parmi les séquences nucléotidiques, séquence N°1, séquence N°2 identifiées dans la description, et leurs séquences complémentaires
10 respectives.
2. Sonde susceptible de s'hybrider spécifiquement avec l'ADN génomique de *Clavibacter michiganensis*,
15 caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une séquence nucléotidique présentant au moins 70 % d'homologie avec au moins une séquence nucléotidique choisie parmi les séquences nucléotidiques, séquence N°1, séquence N°2 identifiées dans la description, et leurs séquences complémentaires
20 respectives.
3. Sonde de capture selon la revendication 2,
caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi les sondes de la revendication 2.
- 25 4. Sonde de détection selon la revendication 2,
caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi les sondes de la revendication 2.
5. Sonde selon l'une des revendications 2 à 4,
30 caractérisée en ce qu'elle est marquée au moyen d'un marqueur choisi parmi des isotopes radioactifs, des molécules enzymatiques telles que la peroxydase et la phosphatase alcaline ou toute autre enzyme susceptible d'hydrolyser un substrat chromogène, fluorigène ou luminescent, des séquences
35 nucléotidiques spécifiques, des composés chimiques chromophores, des composés chromogènes, fluorigènes ou luminescents, des analogues de bases nucléotidiques, des

molécules inertes telles que la biotine, la digoxygénine, des stéroïdes.

6. Amorce spécifique pour l'amplification par la polymérisation de l'ADN génomique de *Clavibacter michiganensis*, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une séquence nucléotidique présentant au moins 70 % d'homologie avec au moins une séquence nucléotidique choisie parmi les séquences nucléotidiques, séquence N°1, séquence N°2 identifiées dans la description, et leurs séquences complémentaires respectives.

7. Couple d'amorce selon la revendication 6, caractérisé en ce que en ce qu'il est choisi parmi les couples d'amorce constitués par une amorce de capture et une amorce de détection, l'une répondant à une séquence N°1 ou à sa séquence complémentaire et l'autre répondant à une séquence N°2 ou à sa séquence complémentaire.

8. Amorce selon l'une des revendications 6 et 7, caractérisée en ce que l'amorce est fixée sur un support ou marquée au moyen d'un marqueur choisi parmi des isotopes radioactifs, des séquences nucléotidiques spécifiques, des molécules enzymatiques telles que la peroxydase et la phosphatase alcaline ou toute autre enzyme susceptible d'hydrolyser un substrat chromogène, fluorigène ou luminescent, des composés chimiques chromophores, des composés chromogènes, fluorigènes ou luminescents, des analogues de bases nucléotidiques, des molécules inertes telles que la biotine, la digoxygénine, des stéroïdes.

9. Réactif pour détecter sélectivement le *Clavibacter michiganensis* dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une sonde selon l'une des revendications 2 à 5.

10. Réactif selon la revendication 9, caractérisé en ce que chaque sonde est en milieu liquide ou fixée sur un support solide directement ou indirectement.

5

11. Réactif pour détecter sélectivement le *Clavibacter michiganensis* dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une amorce selon l'une des revendications 6 à 8.

10

12. Procédé de détection sélective de *Clavibacter michiganensis* dans un échantillon biologique selon l'une des revendications 1 à 5,

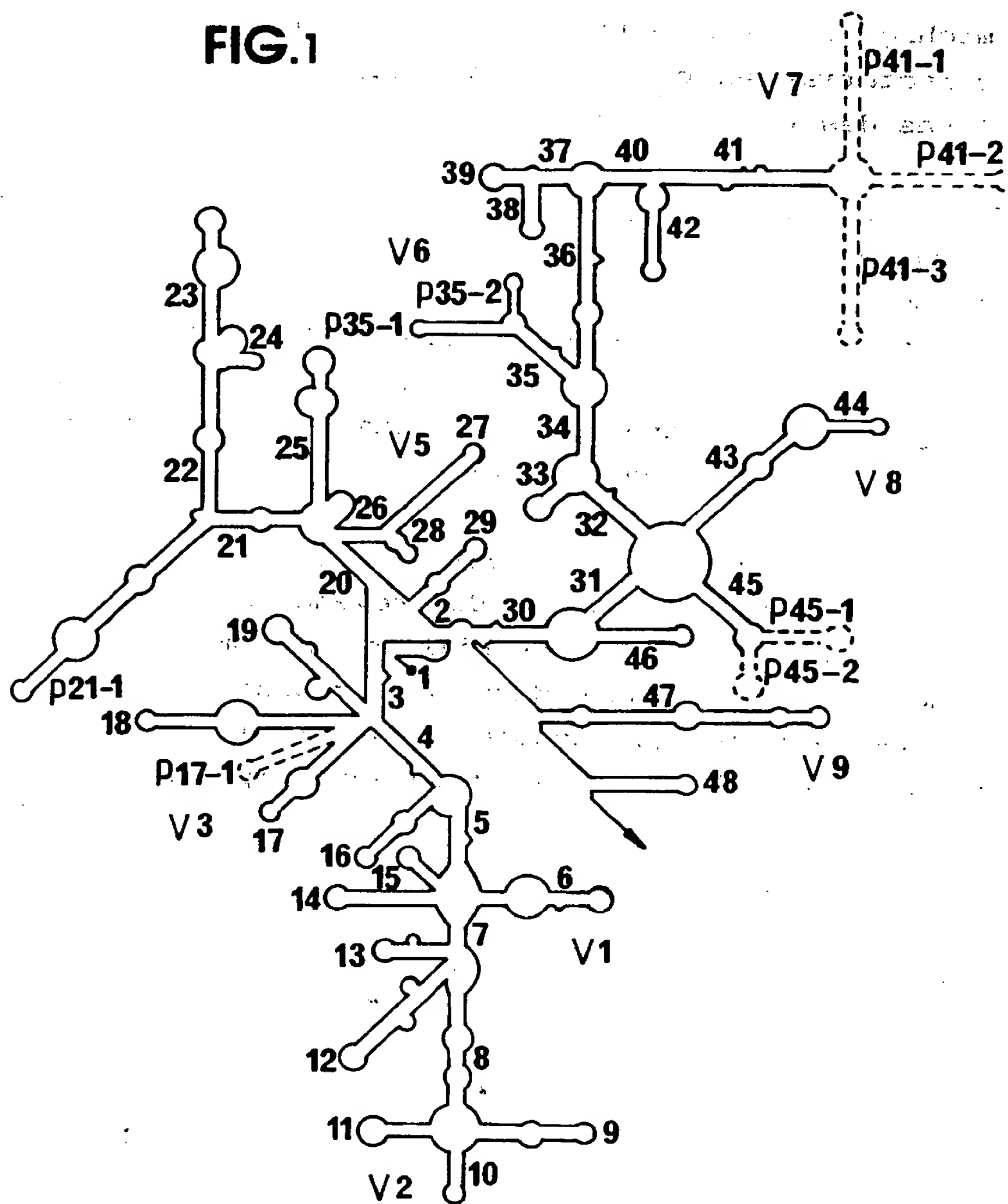
15 caractérisé en ce qu'on expose l'ADN génomique ou l'ARN des bactéries contenu dans ledit échantillon sous forme de fragment monocaténaire à au moins une sonde et on détecte les zones d'hybridation avec ladite sonde.

13. Procédé de détection sélective de *Clavibacter michiganensis* selon l'une des revendications 1 et 7, caractérisé en ce qu'on réalise une amplification de l'ADN génomique de *Clavibacter michiganensis* en présence d'un système enzymatique adapté et au moins un couple d'amorces, en ce qu'on identifie les fragments amplifiés.

25

1/3

FIG. 1



2/3

C.michiganensis * : amorce A3 355 360 GCAGTGGGGAATATTG
 C. non michiganensis : amorce A3
 Curtobacterium@ : amorce A3

370 380 390 400 410
 CACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGAGGGATGAC

420 430 440 450 460
 GG-CTTCGGGGTTGTAAACCTCTTTAGTAGGGGAAGAAAGCGAAAG- -
 G_CTTCGG

480 490 500 510
 - - TGACGGTACCTGCAGAAAAAGCACCGGCTAACTA< - : amor . B3
 CT - : amor . B3
 - : amor . B3

FIG.2

3/3

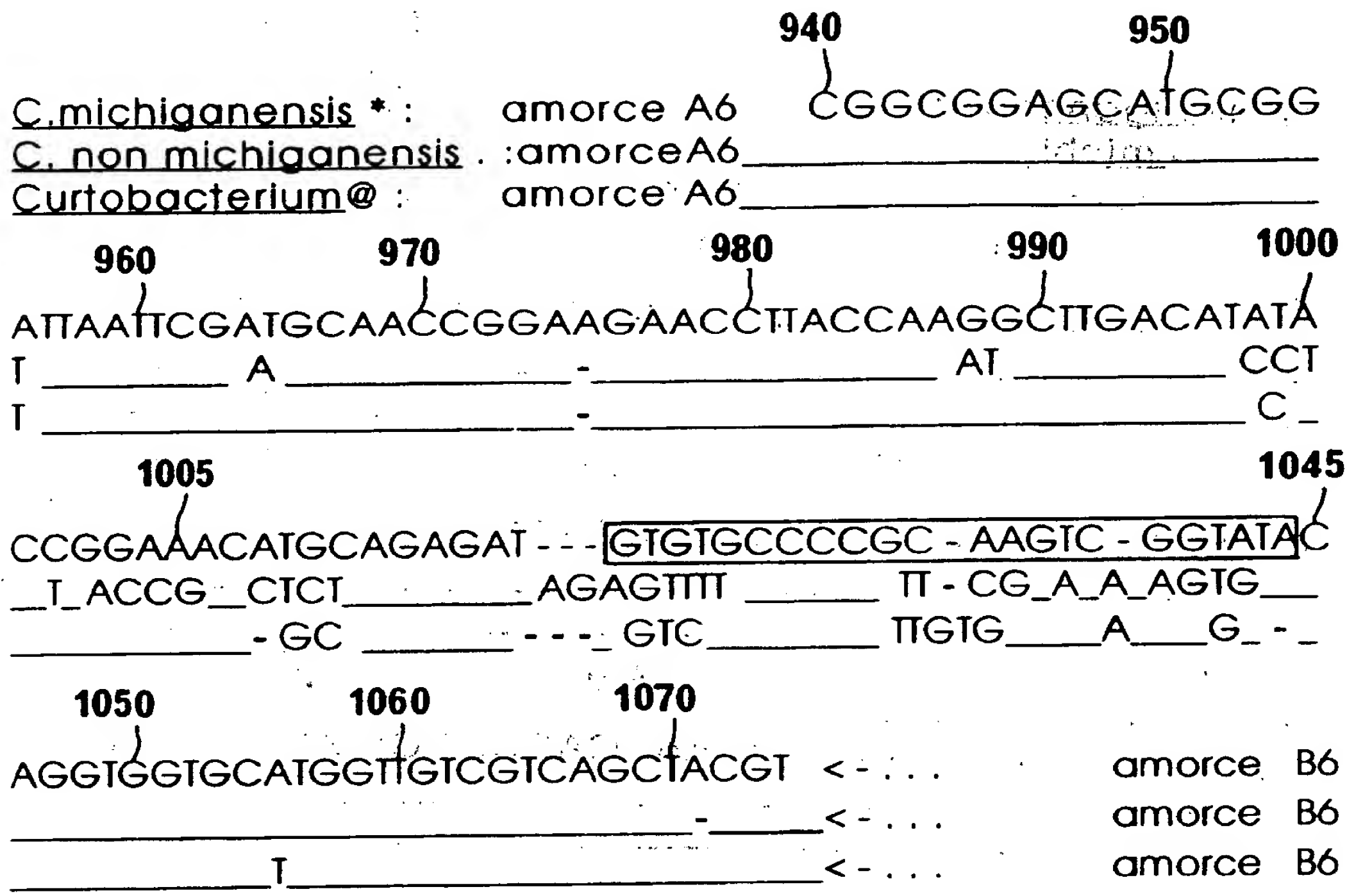


FIG.3

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

2733754

N° d'enregistrement
nationalFA 514053
FR 9505416

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	WO-A-91 00926 (MICROPROBE CORP.) * page 25, ligne 8 * ---	1
X	EP-A-0 529 985 (CHANG, P. ET AL) * page 18, ligne 10 - ligne 12; revendication 4 * ---	1
X	EP-A-0 468 520 (MITSUI TOATSU CHEM INC.) * page 28; revendication 13 * ---	1
A	CANADIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY, vol. 39, no. 11, Novembre 1993 pages 1029-34, MIZRA, M. ET AL. 'Specific 16S ribosomal RNA targeted oligonucleotide probe against Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus' * le document en entier * ---	1-13
A	CANADIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY, vol. 40, no. 2, Février 1994 pages 148-51, FIRRAO, G. ET AL 'Identification of Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus using the polymerase chain reaction' * le document en entier * ---	1-13
A	JOURNAL OF MICROBIOL METHODS, vol. 16, 1992 pages 271-79, DORSCH, M. ET AL 'some modifications in the procedure of direct sequencing of PCR amplified 16S rDNA' * page 276, alinéa 5 - page 277, alinéa 1 * --- -/--	1-13
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. CL.6)
		C12Q
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
25 Janvier 1996		Osborne, H
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

EPO FORM 1503 03.92 (P04C13)

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	WO-A-95 03412 (BIOMERIEUX) * le document en entier * -----	1-13
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. CL. 6)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
25 Janvier 1996		Osborne, H
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

THE
OFFICE
OF THE
SECRETARY
OF THE
NAVY
WASHINGTON
D. C.
20350

1. The
2. The
3. The
4. The
5. The